



**University of
Zurich**^{UZH}

**Zurich Open Repository and
Archive**

University of Zurich
University Library
Strickhofstrasse 39
CH-8057 Zurich
www.zora.uzh.ch

Year: 2021

Gene controlling pollen number - method to identify quantitative gene using genome editing

Kakui, Hiroyuki ; Tsuchimatsu, Takashi ; Yamazaki, Misako ; Shimizu, Kentaro K

Other titles: - -

Posted at the Zurich Open Repository and Archive, University of Zurich

ZORA URL: <https://doi.org/10.5167/uzh-199111>

Journal Article

Published Version

Originally published at:

Kakui, Hiroyuki; Tsuchimatsu, Takashi; Yamazaki, Misako; Shimizu, Kentaro K (2021). Gene controlling pollen number - method to identify quantitative gene using genome editing. Baioaiensu to indasutori, 79:32-33.

角井 宏行・土松 隆志・山崎 美紗子・清水 健太郎

はじめに

種子植物にとって花粉数は、動物における精子数と同様に繁殖に重要な形質である。農業分野では効率的な人工授粉のためには大量の花粉を生産する品種が好まれる一方で、花粉症患者にとっては対象となる植物の花粉数がどのくらい飛散するかは重要な関心事である。このように花粉数は様々な側面において重要な形質であるにも関わらず、花粉数を制御する遺伝子の実体は明らかにされてこなかった。その理由として、花粉数が複数の遺伝子によって制御される複雑な形質（量的形質）であるため、突然変異体スクリーニングを通じた遺伝子単離が困難であったことが挙げられる。また、同一個体でも花によって花粉数が大きく異なるため1花当たりの花粉数を決定するためには大量のデータが必要であるにも関わらず、効率的に花粉数を計測する方法が存在しなかったことが問題であった。

1. 花粉数計測法の開発とゲノムワイド関連解析

そこでまず筆者らはセルカウンターを用いて1花当たりの花粉数を迅速かつ効率的に計測できる方法を開

発した¹⁾。モデル植物であるシロイヌナズナ144系統の花粉数を決定し、ゲノムワイド関連解析 (Genome-wide association study) を用いて花粉数に関わる遺伝子領域を絞り込んだ²⁾。ゲノムワイド関連解析はそれぞれの系統のゲノム配列のデータ (SNP) と興味のある形質の相関関係を解析することで形質と関連度の高い遺伝子 (領域) をピンポイントに絞り込むことができる手法である。解析の結果、花粉数に関連する遺伝子領域がゲノム中に複数存在すること、最も関連度が高い染色体領域が第1染色体に存在することが明らかになった (図1A)。

2. 花粉数を制御する遺伝子の同定

第1染色体上の最も花粉数と関連度が高い遺伝子領域には3つの遺伝子が含まれていた。そこでそれぞれの遺伝子に対してゲノム編集技術の1つであるCRISPR/Cas9法を用いて遺伝子の機能破壊を行い、花粉数を計測した。その結果、1つの遺伝子の機能破壊変異体が正常な個体と比較して約半数しか花粉を生産しないことがわかり (図1B)、さらにこの変異体に正常な遺伝子を再導入した個体は正常な数の花粉を生産することが

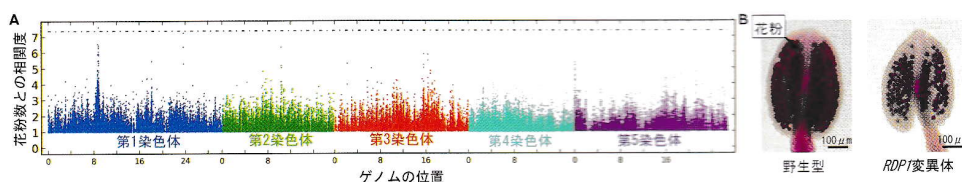


図1 REDUCED POLLEN NUMBER1 (RDP1) 遺伝子の発見

(A) シロイヌナズナ144系統を用いた花粉のゲノムワイド関連解析 (文献²⁾より改変転載)

(B) 野生型とRDP1変異体の葯の顕微鏡観察。花粉を赤紫色に染色している。変異体は野生型の約半数しか花粉を生産しない。

筆者紹介：かくい・ひろゆき (KAKUI, Hiroyuki) 新潟大学 自然科学研究科 (Grad. Sch. Sci. Tech., Niigata Univ.) 特任助教 2009年千葉大学大学院自然科学研究科博士課程修了 博士 (農学) 専門：植物分子生物学

連絡先：〒950-2181 新潟県新潟市西区五十嵐二の町 8050 E-mail: kakui@agr.niigata-u.ac.jp (勤務先)

つちまつ・たかし (TSUCHIMATSU, Takashi) 東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻 (Dept. of Biol. Sci., Grad. Sch. of Sci., The Univ. of Tokyo) 准教授 2010年東京大学大学院総合文化研究科博士課程修了 博士 (学術) 専門：進化生物学

連絡先：〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1 E-mail: tsuchimatsu@bs.s.u-tokyo.ac.jp (勤務先)

やまざき・みさこ (YAMAZAKI, Misako) チューリッヒ大学 (Dept. of Evolutionary Biol. and Environ. Studies, Univ. of Zurich) ラボマネージャー 2008年京都大学大学院理学研究科博士課程修了 博士 (理学) 専門：分子生物学

連絡先：Winterthurerstrasse 190, CH-8057 Zurich, Switzerland E-mail: misako.yamazaki@ieu.uzh.ch (勤務先)

しみず・けんたろう (SHIMIZU, Kentaro K.) 同上 教授 兼任 横浜市立大学本原生物学研究所 客員教授 2002年京都大学大学院理学研究科博士課程修了 博士 (理学) 専門：進化ゲノム学 連絡先：同上 E-mail: kentaro.shimizu@ieu.uzh.ch (勤務先)

分かった。そこでこの遺伝子を、花粉数を制御する遺伝子として *REDUCED POLLEN NUMBER1* (*RDPI*) と名付けた。さらに進化学的な解析を行ったところ、花粉数が少ない系統は *RDPI* 周辺領域の変異が少ないことから、少花粉タイプの *RDPI* が進化の過程で選択されてきたことがわかった。シロイヌナズナは自家生殖（自殖）によって繁殖を行う植物であり、大量の花粉を作ることは自殖植物においては過剰なエネルギー投資につながると考えられる。花粉、つまり雄の配偶子を減らすことは一見不利に思われるが、自殖植物では有利であるという進化理論予測を支持する結果であった³⁾。

3. ゲノム編集による微細なアレル効果の検証

量的形質を制御する遺伝子解析の大きな障害として、通常のトランスジェニック実験では対立遺伝子（アレル）効果を実験的に証明しにくいことが挙げられる。なぜなら、トランスジーン挿入位置によって発現量・表現型にバラつきがあり、小さなアレル効果が検出しがたいからである。そこで、CRISPR/Cas9法を拡張することにより、定量的相補実験（quantitative complementation test）を実現した（図2A）。定量的相補実験は、a) 花粉の多い系統と少ない系統それぞれでゲノム編集を行い *RDPI* 遺伝子機能を破壊し、*RDPI* をヘテロで持つ個体を作成する、b) それぞれのヘテロの個体同士を掛け合わせ、後代を作成する、c) 得られた後代のうち、*RDPI* の花粉が多いタイプを1コピー持つ個体と花粉が少ないタイプを1コピー持つ個体の花粉数を比較しアレルの効果を検証する、という手順で実験を行った。定量的相補実験では *RDPI* のゲノム上の位置を変えることなく、コピー数が揃った状態で形質を比較することができる。解析の結果、アレル間で花粉数の有意な差がみられた一方で、花粉以外の表現型には差がみられなかった（図2B）。このことにより、*RDPI* の野生の対立遺伝子が花粉数を変えるという因果関係を証明できた。この手法は、CRISPR/Cas9システムが使用できさえすれば、植物の花粉数だけでなく、個体サイズや収量等幅広い形質に適用可能である。

おわりに

これまでに花粉の発達に関わる遺伝子が多数同定されており、それらの機能が明らかにされてきた。またこれらの中には雄性不稔（無花粉）の遺伝子として F1

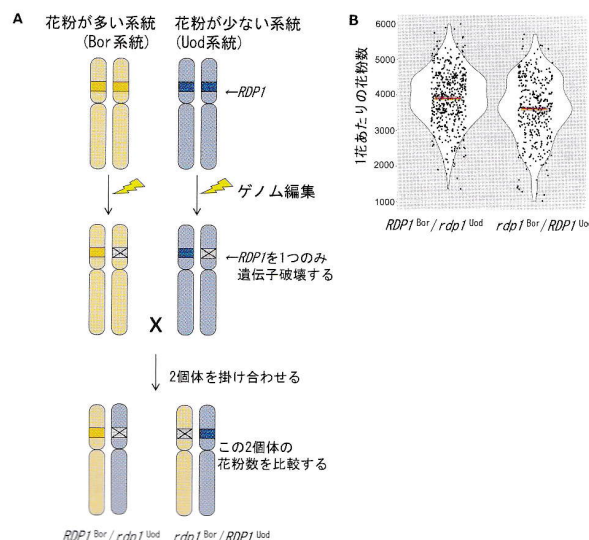


図2 定量的相補実験

- (A) 実験の流れ。花粉数の多い系統と少ない系統についてゲノム編集を用いて *RDPI* を1つ機能破壊する。これらの個体を掛け合わせた後代は遺伝的背景が同一であり、*RDPI* のアレルのみが異なる。
- (B) *RDPI*^{Bor}/*rdp1*^{Uod} と *rdp1*^{Bor}/*RDPI*^{Uod} の花粉数。バイオリンプロットによって花粉数の分布を示した。各点は一花あたりの花粉数に対応している。赤の四角は各遺伝子型における標準誤差を表し、赤四角の中の太い赤線は平均値を示す。
- (文献²⁾より改変転載)

品種作出などに利用されてきたものもある。今回筆者らが明らかにした花粉数に関わる遺伝子 *RDPI* は、花粉の発達とは独立した機能を持つと考えられ、*RDPI* を手掛かりにさらに新規の花粉数を制御する遺伝子を同定していきたい。また *RDPI* はリボソーム制御に関わる遺伝子と相同性を示すことから、植物に普遍的に存在すると考えられる。今後、*RDPI* 遺伝子の利用により、稔性を維持しつつ花粉数を減少させたり、人工授粉など多くの花粉が求められる育種・栽培現場において、様々な植物で花粉数を制御する技術開発への応用が期待される。

参考文献

- 1) Kakui, H. et al.: Pollen grain counting using a cell counter. *Pollen and Pollen Tube Biology*. Springer, 1~11 (2020)
- 2) Tsuchimatsu, T. et al.: Adaptive reduction of male gamete number in the selfing plant *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Commun.*, 11(1), 2885 (2020)
- 3) Shimizu, K.K. et al.: Evolution of selfing: recurrent patterns in molecular adaptation. *Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 46, 593~622 (2005)